亚急性瘤胃酸中毒奶山羊瘤胃上皮形态结构和通透性的变化

程　萌[1]　杨淑青[2]　高　民[3]　谢天宇[4]　孙燕勇[1]　胡红莲[3*]

（1.内蒙古农业大学动物科学学院，呼和浩特 010018；2.江苏蒙彼利生物科技有限公司，常州 213100;3.内蒙古农牧业科学院动物营养与饲料研究所，呼和浩特 010031；4.内蒙古圣牧高科牧业有限公司，呼和浩特 010018）

摘　要：本试验旨在研究亚急性瘤胃酸中毒（SARA）对瘤胃上皮形态结构和通透性的影响。选用体况良好、体重相近的泌乳期萨能奶山羊 9 只，随机分为 3 组（对照组、SARA 组、恢复组，n=3），对照组饲喂基础饲粮[非纤维性碳水化合物与中性洗涤纤维比(NFC/NDF)=1.40]，SARA 组和恢复组先后饲喂 NFC/NDF 为 1.40、1.79、2.31、3.23 的 4 种试验饲粮诱导 SARA 发生，每种饲喂 15 d，恢复组奶山羊待 SARA 诱导成功后自由采食青干草 30 d。对照组奶山羊分别在饲养 30、60（与 SARA 组 3 只同时）和 90 d（与恢复组 3 只同时）各屠宰 1 只。采集瘤胃腹囊部上皮组织用于石蜡切片、透射电子显微镜观察及尤斯灌流系统（Ussing chamber）研究。结果表明：1）组织切片结果显示，瘤胃上皮角质层厚度 SARA 组显著高于对照组和恢复组（P＜0.05），恢复组显著低于对照组（P＜0.05）；颗粒层厚度对照组显著高于 SARA 组和恢复组（P＜0.05），但 SARA 组和恢复组之间无显著差异（P＞0.05）；棘突层厚度 3 组之间无显著差异（P＞0.05）；上皮总厚度恢复组显著低于对照组和 SARA 组（P＜0.05），但对照组与 SARA 组之间无显著差异（P＞0.05）。透射电子显微镜结果显示，SARA 组瘤胃上皮紧密连接被破坏，细胞间隙增大，棘状层细胞线粒体出现降解并出现空泡。2）与对照组相比，SARA 组和恢复组瘤胃上皮短路电流(Isc)、组织导电性(Gt)和辣根过氧化物酶（HRP）流速显著升高（P＜0.05），跨膜电位差（PD）显著降低（P＜0.05）。综合得出，SARA 破坏了奶山羊瘤胃上皮形态结构的完整性，使瘤胃上皮通透性增加，导致瘤胃上皮屏障功能长期受损。

关键词：亚急性瘤胃酸中毒；瘤胃上皮；形态结构；超微结构；通透性

收稿日期：2016-04-12

基金项目：国家自然科学基金（31472124）；现代农业（奶牛）产业技术体系建设专项资金（CARS-37）

作者简介：程　萌（1990—）,女,吉林吉林人，硕士研究生，研究方向为反刍动物营养调控技术及其应用。E-mail： 2979949429@qq.com

*通信作者：胡红莲，研究员，硕士生导师，E-mail： honglianhu2010@163.com

中图分类号：S826

近年来，随着集约化养殖规模的扩大，为了实现生产效率的最大化，高能量饲粮的饲喂模式已成为现代反刍动物集约化生产的显著特征。亚急性瘤胃酸中毒（subacute ruminal acidosis,SARA）正是这种高能量饲喂模式下产生的一种很常见的营养代谢性疾病，具有群发性，对动物健康和养殖效益影响严重。目前已有许多研究表明，当反刍动物发生 SARA 时，瘤胃内环境发生紊乱，发酵异常，微生物菌群结构改变、异常代谢产物如脂多糖（LPS）和组胺累积，加之瘤胃长期处于低 pH 环境，会引起瘤胃黏膜损伤，瘤胃屏障功能降低，导致一些异常代谢产物和病原微生物通过破损的瘤胃黏膜移位进入血液，进一步加重酸中毒引起的瘤胃上皮损伤[1-3]。瘤胃对反刍动物至关重要，其上皮结构和功能的完整性是瘤胃执行消化吸收、屏障等功能的基本保障，对维护动物健康和高效生产意义重大。瘤胃黏膜上皮通透性通常是指黏膜上皮比较容易被一些物质分子以简单扩散的方式通过的特性，这一特性的改变可以反映瘤胃黏膜上皮的损伤程度，是检测瘤胃黏膜上皮屏障功能受损程度的一项重要指标，若黏膜上皮通透性增加则说明黏膜完整性被破坏，其屏障功能受损[4]。近年来的研究表明，SARA 可损害瘤胃黏膜结构，使瘤胃壁黏膜出现不同程度的脱落，显著降低了瘤胃上皮基底层、棘突层、颗粒层和瘤胃上皮的总厚度，使上皮细胞间紧密连接结构变得疏驰，削弱了瘤胃上皮的屏障功能，引起其通透性增加[5-8]。近期本课题组的研究也发现，SARA 影响了瘤胃黏膜上皮的完整性，使瘤胃上皮角质层出现明显脱落和损伤，瘤胃上皮乳头长度、宽度及角质层厚度皆显著降低；同时 SARA 使瘤胃黏膜上皮细胞增殖细胞核抗原（*PCNA*）表达下调，显著减弱了瘤胃上皮细胞的增殖活性，而瘤胃上皮细胞出现过度凋亡，破坏了上皮细胞增殖与凋亡间的动态平衡，导致瘤胃上皮屏障功能受损[9]。另有研究表明，饲喂奶牛高精料饲粮可引起瘤胃上皮细胞之间的细胞间隙增大，破坏紧密连接，削弱瘤胃上皮的屏障功能[10]。目前在奶牛[5]、绵羊[6]及山羊[7,9]的诸多研究表明：SARA 可破坏瘤胃黏膜上皮的完整性，其发病机制与瘤胃黏膜屏障功能受损，通透性增加密切相关，但 SARA 严重程度不同，对瘤胃上皮形态和功能的影响程度也可能有所不同。为此，本研究以奶山羊为动物模型，以逐渐递增饲粮非纤维性碳水化合物与中性洗涤纤维比（NFC/NDF）的方式来诱导奶山羊发生 SARA，通过观察瘤胃上皮组织形态结构和通透性的变化，探讨 SARA 对瘤胃上皮屏障功能的影响，为 SARA 的深入研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

选用 9 只体况良好，体重 35～40 kg，年龄 2～3 岁，均处于泌乳初期且安装有瘤胃瘘管的经产萨能奶山羊为试验动物。试验动物单笼饲养，每天 08：00 和 18：00 分 2 次等量饲喂，自由饮水。

1.2 试验饲粮

参照 NRC(1981)[11]奶山羊营养需要及金公亮[12]推荐的《奶山羊饲养标准》进行配制。以玉米、豆粕、麦麸、青干草、苜蓿为主要原料，设计 NFC/NDF 分别为 1.40、1.79、2.31、3.23 的 4 种试验饲粮，精粗比分别为 51:49、60:40、68:32、79:21。试验饲粮组成及营养水平见表 1。

表 1　试验饲粮组成及营养水平（干物质基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of experimental diets（DM basis）　%

项目 Items	饲粮 NFC/NDF Dietary NFC/NDF			
	1.40	1.79	2.31	3.23
原料 Ingredients				
苜蓿 Alfalfa	30.72	22.00	23.31	16.86
青干草 Green hay	18.57	17.63	8.97	4.50
玉米 Corn	37.88	46.99	57.02	67.37
豆粕 Soybean meal	1.47	4.25	3.81	5.56
麦麸 Wheat bran	8.20	5.14	2.44	0.26
食盐 NaCl	0.46	0.49	0.59	0.70
石粉 Limestone	0.19	0.49	0.50	0.78
预混料 Premix[1)]	2.51	3.01	3.36	3.97
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]				
泌乳净能 NE_L/（MJ/kg）	7.12	7.16	7.30	7.61
粗蛋白质 CP	12.45	12.45	12.44	12.45
非纤维性碳水化合物 NFC	44.45	48.75	52.76	57.35
中性洗涤纤维 NDF	31.78	27.21	22.88	17.75
酸性洗涤纤维 ADF	21.33	17.49	14.95	10.92
钙 Ca	0.54	0.55	0.55	0.57
磷 P	0.32	0.33	0.33	0.34
钙磷比 Ca:P	1.68	1.68	1.68	1.68
精粗比 Concentrate:roughage	51:49	60:40	68:32	79:21

[1)]每千克预混料含有 One kilogram of premix contained the following：$FeSO_4\cdot7H_2O$ 6 240 mg，$CuSO_4\cdot5H_2O$ 300 mg，$MnSO_4\cdot5H_2O$ 1 560 mg，$ZnSO_4\cdot7H_2O$ 3 500 mg，$Co_2Cl\cdot6H_2O$ 206 mg，KI 17 mg，$NaSeO_3$ 130 mg，

VA 1 620 000 IU，VD_3 324 000 IU，VE 540 IU，VK_3 150 mg，VB_{12} 0.9 mg，VB_5 450 mg，泛酸钙 calcium pantothenate 750 mg，叶酸 folic acid 15 mg。

2) 粗蛋白质、中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、钙、磷为实测值，其余为计算值。非纤维性碳水化合物=1-中性洗涤纤维-粗蛋白质-粗脂肪-粗灰分。豆科植物的泌乳净能=[1.044-(0.011 9×酸性洗涤纤维)]×9.29；禾本科植物的泌乳净能=[1.085-（0.012 4×酸性洗涤纤维）]×9.29。CP, NDF, ADF, Ca and P were measured values, while the others were calculated values. NFC＝1-NDF-CP-EE-ash. Leguminous NE_L=[1.044-(0.011 9×ADF)]×9.29； grasses NE_L=[1.085-（0.012 4×ADF）]×9.29.

1.3 试验设计

采用单因子试验设计，将试验动物随机分为 3 组，即对照组（*n*=3）、SARA 组（*n*=3）、恢复组（*n*=3）。对照组从试验开始至屠宰一直饲喂基础饲粮(NFC/NDF=1.40)，SARA 组和恢复组通过逐渐递增精料（NFC/NDF 依次为 1.40、1.79、2.31、3.23）的方式诱导奶山羊发生 SARA，每个 NFC/NDF 饲粮持续饲喂 15 d，共诱导 60 d，SARA 组和恢复组奶山羊 SARA 诱导成功后，SARA 组奶山羊进行屠宰，恢复组奶山羊继续自由采食青干草 30 d，使其逐渐恢复。对照组奶山羊分别在饲养 30、60（与 SARA 组 3 只同时）和 90 d（与恢复组 3 只同时）各屠宰 1 只。采用动态 pH 连续监测记录系统对瘤胃液 pH 进行 24 h 连续监测，以瘤胃液 pH 作为判定 SARA 发生的主要参数，根据 Ramanzin 等[13]、Penner 等[6]和 Penner 等[14]研究结果，当瘤胃液 pH 连续 24 h 内在 5.5~5.2 持续时间达 3 h 以上即视为 SARA 模型成功建立。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 瘤胃上皮组织的采集与处理

对照组、SARA 组和恢复组奶山羊宰杀前禁食 12 h，宰杀后立即取瘤胃腹部盲囊处组织，经无菌生理盐水冲洗干净后，用吸水纸吸干组织块表面水分。取上述组织块 2 cm×2 cm 置于 4%多聚甲醛中固定，用于光学显微镜的观察；取瘤胃腹囊处乳头将其切成 1 mm×1 mm×1 mm 组织块若干置于 2.5%戊二醛中固定，用于透射电子显微镜的观察；同时取 1 cm×1 cm 瘤胃腹囊上皮组织用缓冲溶液冲洗干净，迅速放入已充混合气体（95%O_2、5%CO_2）的保温瓶中用于尤斯灌流系统（Ussing chamber）分析。

1.4.2 瘤胃上皮组织形态结构检测

取瘤胃腹部盲囊处组织块 2 cm×2 cm 置于 4%多聚甲醛中至少固定 48 h，按照常规方法制作石蜡切片，在光学显微镜观察下瘤胃上皮形态学结构。取 1 mm×1 mm×1 mm 组织块置于 2.5%戊二醛中固定 24 h，按照透射电子显微镜的步骤制样，在透射电子显微镜下观察瘤胃上皮超微结构。

1.4.3　瘤胃上皮通透性测定

将采集的新鲜瘤胃腹囊上皮组织剪取 1 cm×1 cm，于冰浴板上迅速剥离肌层，放于固定环上，插入到 Ussing 灌流室两半室中央，分别接通电压电极和电流电极。在 Ussing chamber 系统中，包括 4 组单个独立 Ussing 灌流室，在每个半室中加入 5 mL 的缓冲溶液（已预热），通入混合气体，连接电脑后平衡大约 20 min，待曲线平缓稳定后，供测定短路电流(short-circuit,Isc)、组织导电性(tissue conductance,Gt)和跨膜电位差（potential difference，PD）。曲线平缓稳定后向黏膜侧半室内加入辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP），使其在半室内浓度为 2 μmol/L，每隔 20 min 在浆膜层半室内取 200 μL 缓冲液装入已经准备好的离心管中，于-20 ℃保存用于测定 HRP 浓度。Ussing chamber 缓冲溶液的配制参照文献[15]。

HRP 浓度测定相关溶液配制：1）KH_2PO_4-$NaHPO_4$ 缓冲液，称量 KH_2PO_4 27.2 g 和 $NaHPO_4$ 28.39 g，用 1 000 mL 双蒸水溶解，终浓度为 0.2 mol/L。2）四甲基联苯胺（TMB）溶液，称量 TMB 0.096 2 g，用 50 mL 无水乙醇溶解，用水定容至 100 mL，终浓度为 4 mmol/L。3）H_2O_2，10 μL 30％H_2O_2 与 7 990 μL 水充分混合，终浓度为 0.01 mol/L。

HRP 浓度的测定：根据 Klevenhusen 等[7]和王彤等[16]的 2 种方法相结合，在 15 mL 离心管中加入已配制好的 KH_2PO_4-$NaHPO_4$ 缓冲液 2 mL、0.25 mL 的 TMB 溶液和 0.2 mL 的 H_2O_2，100 μL 含 HRP 的样品，再加水定容至 5 mL，使其充分混匀，在 30 ℃恒温水浴中反应 1 h，再加蒸馏水定容至 10 mL，使反应终止。取 200 μL 配制好的溶液加入 96 孔板中，参比为试剂空白，酶标仪在 380 nm 处测定吸光度值（A）,根据以下回归曲线方程计算出 HRP 浓度(C_{HRP})：

$$A=0.009\,7C_{\mathrm{HRP}}\text{（μg/L）}-0.001\,5\text{（}R=0.997\,2\text{）。}$$

根据 HRP 浓度计算 HRP 从瘤胃上皮浆膜侧向黏膜测的流速。

1.5　数据统计分析

所有数据经 Excel 整理后，采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析（one-way

ANONA)，并进行 Duncan 氏法多重比较检验差异显著性，结果均以平均值±标准差形式表示。

2 结果与分析

2.1 瘤胃液 pH 变化

由表 2 可知，在诱导奶山羊发生 SARA 的过程中随着饲粮 NFC/NDF 的增加，瘤胃液 pH 平均值由 6.20 降低至 5.76，最小值由 5.87 降低至 5.50，最大值由 6.59 降低至 5.98（P<0.05），整体呈下降趋势，瘤胃液 pH 低于 5.5 和 5.8 的时间由 0 和 0.5 h/d 延长至 3.83 和 11.33 h/d（P<0.05），瘤胃液 pH 低于 5.5 和 5.8 的曲线面积由 0 和 0.09 增加至 1.73 和 3.33。由以上数据可知 SARA 模型建立成功。

表 2　奶山羊在诱导 SARA 的过程中瘤胃液 pH 的变化

Table 2　Changes of rumen fluid pH in dairy goats during SARA induction

项目 Items	饲粮 NFC/NDF Dietary NFC/NDF			
	1.40	1.79	2.31	3.23
瘤胃液 pH Rumen fluid pH				
平均值 Mean	6.20±0.18[a]	6.05±0.17[b]	5.88±0.16[c]	5.76±0.16[c]
最小值 Minimum	5.87±0.17[a]	5.73±0.12[b]	5.61±0.22[b]	5.50±0.20[b]
最大值 Maximum	6.59±0.13[a]	6.32±0.05[b]	6.09±0.08[b]	5.98±0.11[c]
持续时间 Duration time/（h/d）				
＜5.8	0.50±0.27[d]	2.33±0.36[c]	5.67±0.81[b]	11.33±0.45[a]
＜5.5	0[c]	0[c]	0.33±0.56[b]	3.83±0.45[a]
曲线面积 Cure area				
＜5.8	0.09±0.02[c]	0.48±0.28[c]	2.44±0.53[b]	3.33±0.40[a]
＜5.5	0[c]	0[c]	0.11±0.01[b]	1.73±0.23[a]

同行数据肩标相同或无小写字母表示差异不显著（P>0.05），不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

In the same row， values with the same or no small letter superscripts mean no significant difference （P > 0.05）, while with different small letter superscripts mean significant difference (P < 0.05).

2.2 SARA 对瘤胃上皮组织形态的影响

2.2.1 SARA 对瘤胃上皮形态学的影响

由表 3 和图 1 可知，瘤胃上皮总厚度对照组高于 SARA 组（P>0.05），对照组和 SARA 组显著高于恢复组（P<0.05）。瘤胃上皮棘突层厚度 3 组之间无显著差异（P>0.05），对照组最高，恢复组最低。瘤胃上皮颗粒层厚度对照组显著高于 SARA 组和恢复组（P<0.05），恢复组高于 SARA 组，但差异不显著（P>0.05）。瘤胃上皮角质层厚度 SARA 组显著高于

对照组和恢复组（P<0.05），对照组显著高于恢复组（P<0.05）。

表 3　SARA 对奶山羊瘤胃上皮各层厚度的影响

Table 3　Effects of SARA on thickness of different stratums of rumen epithelium in dairy goats　μm

项目 Items	对照组 Control group	SARA 组 SARA group	恢复组 Recovery group
上皮总厚度 Total thickness of epithelium	142.57±5.77[a]	134.74±4.87[a]	115.60±3.59[b]
棘突层厚度 Spinosum stratum thickness	92.13±4.93	82.10±3.76	81.20±3.14
颗粒层厚度 Granulosum stratum thickness	32.33±1.34[a]	18.71±0.67[b]	21.35±0.74[b]
角质层厚度 Stratum corneum thickness	18.12±5.77[b]	33.94±1.65[a]	13.05±0.53[c]

同行数据肩标相同或无小写字母表示差异不显著（P>0.05），不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下表同。

In the same row， values with the same or no small letter superscripts mean no significant difference （P > 0.05）， while with different small letter superscripts mean significant difference (P < 0.05). The same as below.

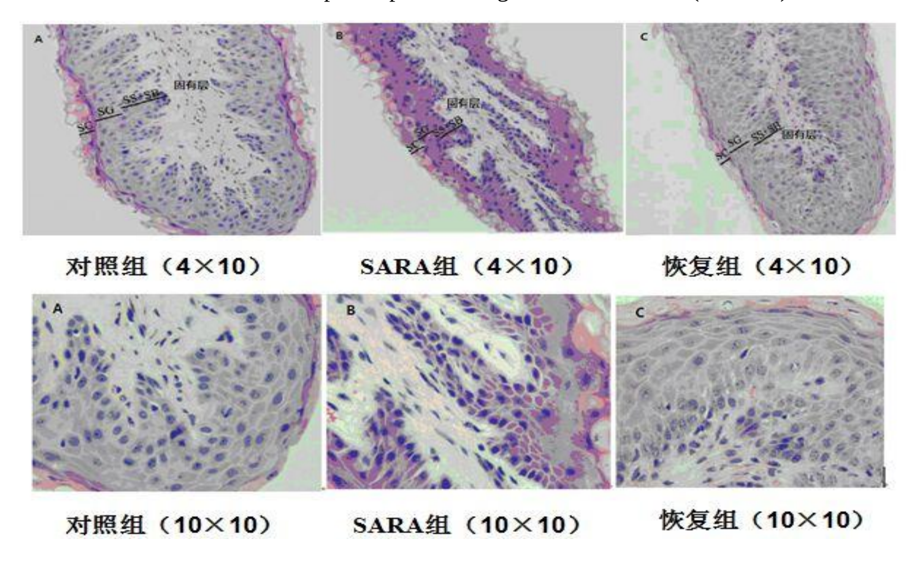


图 1　SARA 对奶山羊瘤胃上皮乳头形态学的影响

Fig.1　Effects of SARA on nipple morphology of rumen epithelium in dairy goats

2.2.2　SARA 对瘤胃上皮超微结构的影响

对照组的瘤胃上皮细胞的细胞器正常（图 2-A、图 2-B），完整的紧密连接结构数量较多（图 2-C）。SARA 组的瘤胃上皮细胞的界限模糊，棘突层细胞线粒体出现降解（图 2-D），并出现空泡（图 2-E），紧密连接结构被破坏，结构松散并出现降解（图 2-F）。恢复组的瘤胃上皮部分区域紧密连接结构数量较 SARA 组和对照组多（图 2-G、图 2-I），但是仍有损伤较严重的部位没有恢复（图 2-H），且细胞间有空洞出现。

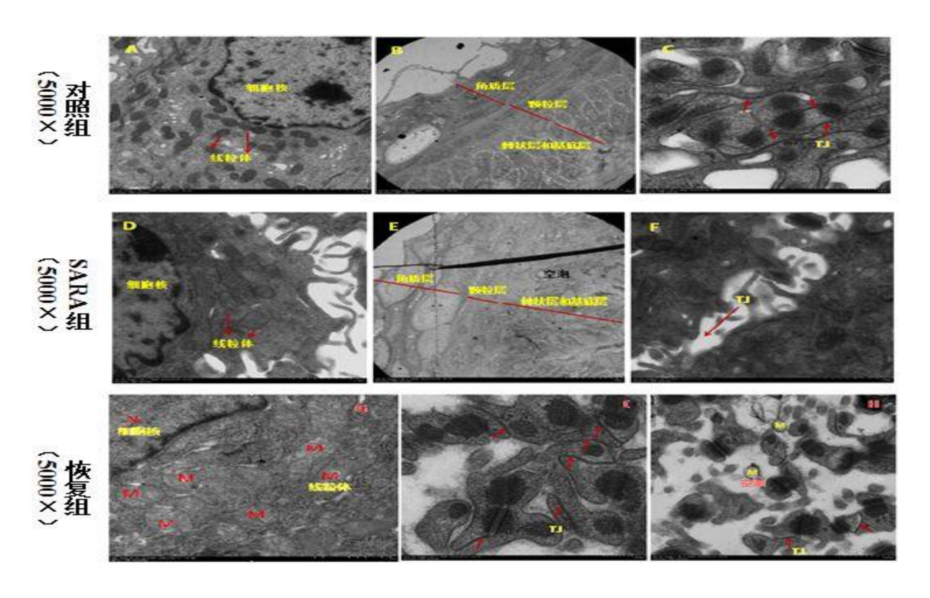


图 2　SARA 对奶山羊瘤胃上皮超微结构的影响

Fig.2　Effects of SARA on ultrastructure of rumen epithelium in dairy goats

2.3　SARA 对瘤胃上皮通透性的影响

由表 4 可知，瘤胃上皮 Isc 和 Gt SARA 组显著高于对照组（$P < 0.05$）,略高于恢复组，但差异不显著（$P > 0.05$）；PD SARA 组显著低于对照组（$P < 0.05$）,也低于恢复组，但差异不显著（$P > 0.05$）。与对照组相比，SARA 组和恢复组的瘤胃上皮 Isc 分别提高了 157%和 128%，Gt 分别提高了 24%和 20%，PD 分别降低了 53%和 38%；与恢复组相比，SARA 组的瘤胃上皮 Isc 和 Gt 分别提高了 13%和 3%，PD 则降低了 25%。结果提示，SARA 对瘤胃上皮电生理参数产生了显著影响，使瘤胃上皮通透性增大，且恢复组仍保持较高的通透性。

表 4　SARA 对奶山羊瘤胃上皮电生理指标的影响

Table 4　Effects of SARA on electric-physiological properties of rumen epithelium in dairy goats

项目 Items	对照组 Control group	SARA 组 SARA group	恢复组 Recovery group
短路电流 Isc	0.47 ± 0.03^{b}	1.21 ± 0.48^{a}	1.07 ± 0.20^{a}
组织导电性 Gt	2.84 ± 0.24^{b}	3.51 ± 1.18^{a}	3.40 ± 0.81^{a}
跨膜电位差 PD	1.37 ± 0.48^{a}	0.64 ± 0.15^{b}	0.85 ± 0.04^{b}

由图 3 可知，瘤胃上皮 HRP 流速对照组显著低于 SARA 组和恢复组（$P < 0.05$），恢复组低于 SARA 组，但差异不显著($P>0.05$)。与对照组相比，HRP 流速 SARA 组和恢复组分别提高了 73%和 68%。

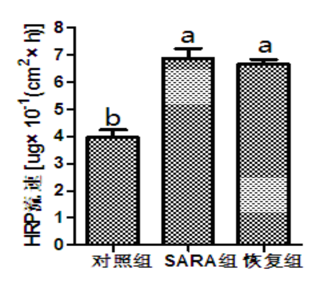


图 3　SARA 对奶山羊瘤胃上皮 HRP 流速的影响

Fig.3　Effects of SARA on HRP flux rate of rumen epithelium in dairy goats

3　讨　论

3.1　SARA 对瘤胃上皮形态结构的影响

瘤胃上皮由黏膜层到浆膜层分为角质层、颗粒层、棘状层及基底层 4 层细胞层。因此，与肠单层上皮相比，瘤胃内毒素和细菌不容易通过瘤胃上皮进入浆膜层及外周血液，而且完整的瘤胃上皮形态结构是保持正常瘤胃上皮屏障功能的结构基础，瘤胃上皮角质层和颗粒层细胞等形成的屏障能够将瘤胃内的有害物质隔离出来避免对机体的伤害。瘤胃上皮的完整性受到多种因素影响，饲粮精粗比是主要因素之一，精粗比太高会导致乳头角质化不全，形态异常[17-18]。本试验结果发现，SARA 引起瘤胃上皮形态的显著性变化，表现为 SARA 降低了瘤胃上皮总厚度和棘突层厚度，显著降低了颗粒层厚度，但使角质层厚度显著增加。这与 Steele 等[5]高谷物饲粮显著降低了瘤胃上皮总厚度、颗粒层厚度和棘突层厚度的试验结果相一致。但郇宇航等[9]研究表明，瘤胃上皮角质层厚度恢复组显著高于 SARA 组，但显著低于对照组，与本试验结果不相符，产生差异的原因可能在于取样部位不同以及 SARA 严重程度不同，郇宇航等[9]研究中瘤胃液 pH 在 5.5~5.2 每日持续时间长达 7.58 h 以上，而本试验瘤胃液 pH 在 5.5~5.2 波动时间仅 3.83 h，pH 在 5.5~5.2 持续时间不同，SARA 严重程度也不同。但郇宇航等[9]和本试验结果均发现，瘤胃上皮角质层厚度恢复组显著低于对照组，这表明 SARA 对瘤胃上皮的形态产生了长期影响作用。同时本试验超微结构结果显示，SARA 组瘤胃上皮紧密连接结构被破坏，细胞间隙增大，线粒体出现降解，棘突层出现气泡，上皮细胞界限模糊，而且恢复组损伤较为严重的部位并未完全恢复。以上结果提示，SARA 破坏了瘤胃上皮的形态结构，削弱了瘤胃上皮的屏障功能，且对瘤胃上皮形态结构的影响具有长期性。

3.2　SARA 对瘤胃上皮通透性的影响

瘤胃上皮通透性增高是反映早期瘤胃上皮屏障损伤的重要标志。研究 Ussing chamber

系统中的电生理指标可反映瘤胃上皮组织的通透性，Isc 主要反映离子通过上皮的转运能力，Gt 反映上皮细胞对离子的通透性，PD 主要说明瘤胃上皮组织的活性，这些电生理指标体现了上皮组织的屏障通透性[19]。在 Ussing chamber 技术中利用同位素标记或大分子标记物通过胃肠道上皮的比例来检测其上皮通透性已成为比较常用且非常重要的手段[20]，常用的标记物如 HRP、异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）、^{3}H-甘露醇[6-7]。随着 Ussing chamber 技术的不断应用和改良，这一技术已成为目前胃肠道屏障功能研究的金标准。

胃肠道上皮通透性通常是指黏膜上皮比较容易被一些物质分子以简单扩散的方式通过的特性，这一特性的改变能够反映上皮的损伤程度，是检测胃肠道屏障受损的重要指标。若黏膜通透性增加则说明黏膜完整性被破坏，其屏障功能受损。本试验发现，SARA 组和恢复组瘤胃上皮 Isc 与对照组相比显著增加了，分别提高了 157%和 128%；SARA 组和恢复组瘤胃上皮 Gt 与对照组相比显著增加了，分别提高了 24%和 20%；PD 显著降低了，分别降低了 53%和 38%；瘤胃上皮 HRP 流速对照组显著低于 SARA 组和恢复组，恢复组低于 SARA 组，但差异不显著；与对照组相比，HRP 流速 SARA 组和恢复组分别提高了 73%和 68%。Penner 等[6]利用 Ussing chamber 系统研究了轻微的 SARA 在短期内对瘤胃上皮屏障功能的影响，结果表明 Gt 升高。Klevenhusen 等[7]利用 Ussing chamber 系统研究了高谷物饲粮对山羊瘤胃上皮通透性的影响，结果发现，高谷物饲粮组瘤胃上皮 Isc、Gt 和 HRP 浓度与对照组相比均显著提高；Aschenbach 等[21]利用 Ussing chamber 系统在体外条件下研究发现，pH 为 5.1 时瘤胃上皮 Gt 增加，Isc 降低；Penner 等[6]利用直接灌注葡萄糖的方式诱导绵羊发生 SARA，结果显示瘤胃上皮 Gt 和 ^{3}H-甘露醇标记的同位素从瘤胃上皮浆膜侧向黏膜测的流速增加，Isc 降低，瘤胃上皮通透性随着酸度的增加而增加。本试验结果与上述结果部分一致，说明了 SARA 能破坏瘤胃上皮的完整性，使瘤胃上皮通透性增加，瘤胃上皮的屏障功能受损。

4 结 论

SARA 破坏了奶山羊瘤胃上皮形态结构的完整性，使瘤胃上皮通透性增加，导致瘤胃上皮屏障功能长期受损。

参考文献：

[1] 徐俊,苏衍菁,张养东,等.亚急性瘤胃酸中毒对瘤胃异常代谢产物和微生物组成的影响[J].

中国奶牛,2012(9):17–20.

[2] 胡红莲,刘大程,卢德勋,等.日粮不同非纤维性碳水化合物与中性洗涤纤维的比值对奶山羊瘤胃液和血液中内毒素、组织胺含量的影响[J].中国畜牧兽医,2012,39(3):104–109.

[3] KHAFIPOUR E,KRAUSE D O,PLAIZIER J C.A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation[J].Journal of Dairy Science,2009,92(3):1060–1070.

[4] 刘坚,侯永清,丁斌鹰,等.α-酮戊二酸对脂多糖应激断奶仔猪空肠黏膜蛋白合成和抗氧化能力的影响[J].中国畜牧杂志,2010,46(11):35–38.

[5] STEELE M A,CROOM J,KAHLER M,et al.Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis[J].American Journal of Physiology:Regulatory,Integrative and Comparative Physiology,2011,300(6):R1515-R1523.

[6] PENNER G B,OBA M,GÄBEL G,et al.A single mild episode of subacute ruminal acidosis does not affect ruminal barrier function in the short term[J].Journal of Dairy Science,2010,93(10):4838–4845.

[7] KLEVENHUSEN F,HOLLMANN M,PODSTATZKY-LICHTENSTEIN L,et al.Feeding barley grain-rich diets altered electrophysiological properties and permeability of the ruminal wall in a goat model[J].Journal of Dairy Science,2013,96(4):2293–2302.

[8] STEELE M A,GREENWOOD S L,CROOM J,et al.An increase in dietary non-structural carbohydrates alters the structure and metabolism of the rumen epithelium in lambs[J].Canadian Journal of Animal Science,2012,92(2):123–130.

[9] 邬宇航,殷兆丽,刘大程,等.亚急性瘤胃酸中毒对瘤胃、瓣胃上皮细胞增殖与凋亡的影响[J].动物营养学报,2013,25(11):2612–2622.

[10] 王娟.不同精粗比日粮对奶牛和山羊瘤胃上皮屏障的影响[D].硕士学位论文.南京:南京农业大学,2012.

[11] NRC.Nutrient requirements of goats:angora,dairy,and meat goats in temperate and tropical countries[S].Whington,D.C.:National Academy Press,1981.

[12] 金公亮.奶山羊饲养标准[J].畜牧兽医杂志,1989(2):7–12.

[13] RAMANZIN M,BAILONI L,SCHIAVON S,et al.Effect of monensin on milk production and efficiency of dairy cows fed two diets differing in forage to concentrate ratios[J].Journal of Dairy Science,1997,80(6):1136–1142.

[14] PENNER G,BEAUCHEMIN K A,MUTSVANGWA T.Severity of ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period[J].Journal of Dairy Science,2007,90(1):365–375.

[15] 杨淑青.亚急性瘤胃酸中毒对奶山羊瘤胃上皮屏障功能影响机制的研究[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2014.

[16] 王彤,刘会峦.3,3’,5,5’-四甲基联苯胺-H_2O_2-HRP 分光光度法测定 HRP 的研究[J].青岛大学学报:工程技术版,2004,19(3):17–20.

[17] 张素华,李岩.瘤胃生理与奶牛过饲精料引发疾病的研究[J].动物科学与动物医学,2002,19(9):19–21.

[18] NOCEK J E,HEALD C W,POLAN C E.Influence of ration physical form and nitrogen availability on ruminal morphology of growing bull calves[J].Journal of Dairy Science,1984,67(2):334–343.

[19] LODEMANN U,MARTENS H.Effects of diet and osmotic pressure on Na+ transport and tissue conductance of sheep isolated rumen epithelium[J].Experimental Physiology,2006,91(3):539–550.

[20] MAEKAWA M,BEAUCHEMIN K A,CHRISTENSEN D A.Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities,saliva production,and ruminal pH of lactating dairy cows[J].Journal of Dairy Science,2002,85(5):1165–1175.

[21] ASCHENBACH J R,GÄBEL G.Effect and absorption of histamine in sheep rumen:significance of acidotic epithelial damage[J].Journal of Animal Science,2000,78(2):464–470.

Effects of Subacute Ruminal Acidosis on Ruminal Epithelial Morphology and Permeability in Dairy Goats

CHENG Meng[1] YANG Shuqing[2] GAO Min[3] XIE Tianyu[4] SUN Yanyong[1] HU Honglian[3*]

(1. *College of Animal Sciences, Inner Mongolia Agricultural University*, *Huhhot* 010018, *China*; 2. *Jiangsu Mengbili Biological Technology Co., Ltd.*， *Changzhou* 213100，*China*； 3. *Institute of Animal Nutrition and Feed*， *Inner Mongolia Academy of Agricultural & Animal Husbandry Sciences*， *Hohhot* 010031, *China*； 4. *Inner Mongolia Holy Priest High-Tech Animal Husbandry Co., Ltd.*, *Hohhot* 010018, *China*)

Abstract: The objective of this experiment was to study the effects of subacute ruminal acidosis (SARA) on ruminal epithelial morphology and permeability in dairy goats. Nine healthy lactating Saanen dairy goats with similar body weight were randomly divided into three groups (control group, SARA group and recovery group, *n*=3). Dairy goats in control group were fed a basal diet [non-fibre carbohydrates/neutral detergent fibre (none fiber carbon NFC/NDF)=1.40], those in SARA group and recovery group were fed experimental diets with different NFC/NDFs (1.40, 1.79, 2.31 and 3.23 in order, each for 15 days), which gradually induced SARA， and those in recovery group were *ad libitum* fed green hay for 30 days after SARA. One of 3 goats in control group were slaughtered on days 30, 60 (together with 3 goats in SARA group) and 90 d of feeding (together with 3 goats in recovery group), respectively. Samples of the ruminal epithelium from ventral sac were collected to make paraffin section, observe under transmission electron microscope and do Ussing chamber analysis. The results showed as follows: 1) the results of histological slice revealed that the thickness of ruminal epithelial stratum corneum in SARA group was significantly higher than that in control and recovery groups ($P<0.05$), and recovery group was significantly lower than control group ($P<0.05$); the thickness of granulosum stratum in control group was significantly higher than that in SARA and recovery groups ($P<0.05$)， but there was no significant difference between SARA group and recovery group ($P>0.05$); the thickness of spinosum stratum in three groups had no significant difference ($P>0.05$); the total thickness of the rumen epithelium in recovery group was significantly lower than that in control

*Corresponding author, professor, E-mail： honglianhu2010@163.com (责任编辑　王智航)

and SARA group ($P<0.05$)， but there was no significant difference between control and SARA groups ($P>0.05$). The results of transmission electron microscope showed rumen epithelial tight junction structure in SARA group was destroyed and intercellular space was increased，and spinosum stratum cell mitochondria was degraded and showed vacuoles. 2) Compared with control group, the short-circuit， tissue conductance and the flux rate of horseradish peroxidase of rumen epithelium in SARA and recovery groups were significantly increased ($P<0.05$), and potential difference was significantly decreased ($P<0.05$). In conclusion, SARA impairs the integrity of ruminal epithelial morphological structure in dairy goats， and causes an increase in ruminal epithelial permeability, which results in rumen epithelial barrier function long-term damage.

Key words: subacute ruminal acidosis; rumen epithelium; morphology; ultramicrostructure；permeability